

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT).

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/87, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/25508 (43) Date de publication internationale: 22 août 1996 (22.08.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00248</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 février 1996 (15.02.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/01865 17 février 1995 (17.02.95) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gerardo [IL/FR]; 3, impasse Eugène-Delacroix, F-94000 Créteil (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 50, rue du Disque, F-75645 Paris Cédex 13 (FR). SCHWARTZ, Bertrand [FR/FR]; 13-15, rue Paul-Bert, F-94700 Maisons-Alfort (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: NUCLEIC ACID-CONTAINING COMPOSITION, PREPARATION AND USE THEREOF</p>		
<p>(54) Titre: COMPOSITIONS CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES, PREPARATION ET UTILISATION</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>Pharmaceutical composition useful for transfecting a nucleic acid and characterised in that it contains, in addition to said nucleic acid, at least one transfecting agent and a compound causing the condensation of said nucleic acid, wherein said compound is totally or partly derived from a histone, a nucleoline, a protamine and/or a derivative thereof. The use of said composition for transferring nucleic acids in vitro, ex vivo and/or in vivo is also described.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention concerne une composition pharmaceutique utile pour la transfection d'un acide nucléique caractérisée en ce qu'elle contient outre ledit acide nucléique, au moins un agent de transfection et un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique, ledit composé dérivant en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés. Elle se rapporte en outre à l'utilisation de ladite composition pour le transfert in vitro, ex vivo et/ou in vivo d'acides nucléiques.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES.
PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique et s'intéresse plus particulièrement au transfert in vitro, ex vivo et/ou in vivo du matériel génétique.

5 Elle propose notamment une nouvelle composition pharmaceutique utile pour transférer efficacement des cellules. Elle se rapporte également aux utilisations de cette composition.

Des déficiences et/ou anomalies (mutation, expression aberrante, etc) chromosomiques sont à l'origine de nombreuses maladies, à caractère héréditaire ou
10 non. Pendant longtemps, la médecine conventionnelle est demeurée impuissante à leur égard. Aujourd'hui, avec le développement de la thérapie génique, on espère pouvoir désormais corriger ou prévenir ce type d'aberration chromosomique. Cette nouvelle médication consiste à introduire une information génétique, dans la cellule ou l'organe affecté, en vu de corriger cette déficience ou anomalie ou encore, d'y exprimer une
15 protéine d'intérêt thérapeutique.

L'obstacle majeur à la pénétration d'un acide nucléique dans une cellule ou un organe cible, repose sur la taille et la nature polyanionique de cet acide nucléique qui s'opposent à son passage à travers les membranes cellulaires.

Pour lever cette difficulté, diverses techniques sont aujourd'hui proposées dont
20 plus particulièrement la transfection d'ADN nu à travers la membrane plasmique in vivo (WO90/11092) et la transfection d'ADN via un vecteur de transfection.

En ce qui concerne, la transfection d'ADN nu, son efficacité demeure encore très faible. Les acides nucléiques nus possèdent une demi vie plasmatique courte en raison de leur dégradation par les enzymes et de leur élimination par les voies
25 urinaires.

Pour ce qui est de la seconde technique, elle propose principalement deux stratégies:

La première met en oeuvre les vecteurs de transfection naturels que sont les virus. Il est ainsi proposé d'utiliser les adénovirus, les herpès virus, les rétrovirus et
30 plus récemment les virus adéno associés. Ces vecteurs s'avèrent performants sur le

plan de la transfection mais on ne peut malheureusement exclure totalement à leur égard certains risques de pathogénicité, répllication et/ou immunogénicité, inhérents à leur nature virale.

5 La seconde stratégie consiste avantageusement à utiliser des agents non viraux capables de promouvoir le transfert et l'expression d'ADN dans des cellules eucaryotes.

L'objet de la présente invention s'inscrit plus particulièrement dans cette seconde stratégie.

10 Les vecteurs chimiques ou biochimiques représentent une alternative avantageuse aux virus naturels en particulier pour cette absence de réponse immunologique et/ou recombinaison virale. Ils ne possèdent pas de pouvoir pathogène, le risque de multiplication de l'ADN au sein de ces vecteurs est nul et il ne leur est attaché aucune limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer.

15 Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, condenser l'ADN à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires.

20 De part sa nature polyanionique, l'ADN n'a naturellement aucune affinité pour la membrane plasmique des cellules également polyanionique. Pour pallier à cet inconvénient, les vecteurs non viraux possèdent généralement tous des charges polycationiques.

25 Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants sont les plus avantageux. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Plus récemment, il a été développé le concept de la transfection ciblée, médiée par un récepteur. Cette technique met à profit le principe de condenser l'ADN, grâce au polymère cationique, tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane à l'aide d'un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type
30 cellulaire que l'on veut greffer. Les ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes ont ainsi été décrits.

Toutefois, les vecteurs synthétiques proposés aujourd'hui sont encore loin d'être aussi performants que les vecteurs viraux. Ceci pourrait être la conséquence d'une condensation insuffisante de l'ADN à transfecter et/ou des difficultés rencontrées par l'ADN transfecté pour sortir de l'endosome et pénétrer dans le noyau cellulaire.

- 5 Enfin, d'autres inconvénients sont directement associés à la nature des polymères cationiques des lipofectants utilisés.

La présente invention a précisément pour objectif de proposer une solution avantageuse à ces problèmes.

- 10 Plus précisément, la présente invention se rapporte à une composition pharmaceutique utile pour la transfection d'un acide nucléique caractérisée en ce qu'elle contient outre ledit acide nucléique, au moins un agent de transfection et un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique, ledit composé dérivant en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés.

- 15 De manière inattendue, la demanderesse a démontré que la présence d'un tel composé, au sein d'une composition transfectante à base d'un agent de transfection classique, permettait de diminuer considérablement la quantité en cet agent, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante de ladite composition. Au contraire,
20 celle-ci possède avantageusement un niveau de transfection supérieur.

- Au sens de l'invention, un composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, couvre tout composé compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est
25 directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique.

- Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le composé intervenant au niveau de la condensation de l'acides nucléique est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) SEQ ID N°1 et/ou (ATPAKKAA) SEQ ID N°2 ou
30 un de leurs dérivés, le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière

continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple un ou plusieurs acides aminés ou de nature chimique.

Le choix particulier à titre de composé selon l'invention, d'un peptide ou pseudopeptide possédant une majorité d'acides aminés à caractère basique comme la lysine, l'histidine ou l'arginine est particulièrement avantageux dans le cadre de la présente invention. Ce composé peut en outre posséder une structure conformationnelle feuillet β . Les acides aminés basiques sont en effet plus spécifiquement impliqués dans les liaisons peptide-acide nucléique. Ils participent à l'établissement des liaisons ioniques hydrogène entre les deux entités favorisant ainsi la condensation de l'acide nucléique. Quant à la structure feuillet β , elle se caractérise par une meilleure accessibilité d'une majorité des liaisons carbonyles et des atomes d'hydrogène qui de part leurs caractères accepteur et donneur respectifs privilégient également la formation de liaisons avec l'acide nucléique à compacter.

Il s'agit plus préférentiellement, de tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, de la protamine et/ou un de leurs dérivés.

Les histones et les protamines sont des protéines cationiques compactant naturellement l'ADN. Elles sont ainsi responsables in vivo de la condensation de l'ADN non transcrit, de l'ADN de certains virus. A titre d'histones pouvant être mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention, on peut plus particulièrement citer les histones H1, H2a, H3 et H4. En ce qui concerne la nucléoline, il s'agit d'une protéine nucléolaire qui semble posséder un effet synergique vis à vis de l'histone H1 lors de la condensation de l'ADN par celle-ci. Dans le cadre de la présente invention, le composé peut être avantageusement représenté par une séquence peptidique dérivant de la partie N terminale de la nucléoline, et plus précisément correspondant à la séquence (ATPAKKAA)₂(COOH) (SEQ ID N°3).

De préférence, le composé mis en oeuvre selon l'invention est une séquence dérivée de l'histone H1, et plus préférentiellement de son domaine C terminal et plus particulièrement correspond à la séquence (KTPKKAKKP)₂(COOH). (SEQ ID N°4)

A titre illustratif de cette famille de composés selon l'invention on peut également citer les oligopeptides suivants:

ATPKKSAKKTTPKKAKKP(COOH). (SEQ ID N°5) et
KKAQSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA (COOH). (SEQ ID N°6).

En ce qui concerne plus particulièrement les séquences dérivant de la
protamines pouvant être également mises en oeuvre dans le cadre de la présente
5 invention, on peut notamment proposer les oligopeptides suivants:
SRSRYRQRQSRRRRRR(COOH). (SEQ ID N°7) et
RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR(COOH). (SEQ ID N°8).

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne tout peptide,
pseudopeptide (peptide incorporant des éléments non biochimiques) ou protéine
10 différant de la protéine ou peptide considéré, obtenu par une ou plusieurs
modifications de nature génétique et/ou chimique. Par modification de nature
génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion,
addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus de la protéine considérée. Plus
précisément, par modification chimique, on entend toute modification du peptide ou
15 protéine générée par réaction chimique ou par greffage chimique de molécule(s),
biologique(s) ou non, sur un nombre quelconque de résidus de la protéine. Par
modification génétique, on entend toute séquence peptidique dont l'ADN hybride avec
ces séquences ou des fragments de celles-ci et dont le produit possède l'activité
indiquée. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que
20 notamment celui d'augmenter l'affinité du polypeptide correspondant pour son(s)
ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à
des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer
de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés
résultant d'une addition, on peut citer par exemple les séquences peptidiques chimères
25 comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme
dérivé comprend également les séquences protéiques homologues à la séquence
considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine
humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité du même type. De telles
séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation de
30 l'ADN correspondant. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banques
d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de
celle-ci, dans des conditions de stringence conventionnelles (Maniatis et al.), (Cf
techniques générales de biologie moléculaire), ou, de préférence, dans des conditions
de stringence élevées.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions de la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers
5 certains types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques, etc). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau, etc).

Plus préférentiellement, l'élément de ciblage est lié, de manière covalente ou
10 non covalente, au composé selon l'invention. L'élément de ciblage peut également être lié à l'acide nucléique. Selon un mode privilégié de l'invention, ledit composé est associé, via une partie hétérologue supplémentaire liée à une de ses extrémités. De telles parties peuvent notamment être des peptides de type fusogène pour favoriser la transfection cellulaire c'est-à-dire privilégier le passage de la composition transfectante
15 ou de ses divers éléments à travers des membranes, aider à la sortie des endosomes ou encore pour traverser la membrane nucléaire. Il peut également s'agir d'un ligand de récepteur cellulaire présent à la surface du type cellulaire comme par exemple un sucre, la transferrine, l'insuline ou la protéine asialo-orosomucoïde. Il peut également s'agir d'un ligand de type intracellulaire comme une séquence signal de location
20 nucléaire, nls, qui privilégie l'accumulation de l'ADN transfecté au sein du noyau.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les hormones, les vitamines, les cytokines, les oligonucléotides, les lipides ou des séquences ou fractions issues de ces éléments et permettant une liaison spécifique avec les récepteurs correspondants.
25 Préférentiellement, il s'agit de sucres et/ou peptides tels que des anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs, etc. En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines cellulaires ou de récepteurs de protéines d'adhésion. On peut
30 également citer le récepteur de la transferrine, des HDL et des LDL. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs asialoglycoprotéiques, ou encore un fragment Fab d'anticorps permettant de cibler le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines.

A titre illustratif de ce type d'association, on peut notamment mettre en oeuvre dans le cadre de la présente invention, un composé de type H₁-nls et plus préférentiellement un peptide possédant la séquence PKKKRKV-bAla-(KTPKKAKKP)₂(COOH) (SEQ ID N°9).

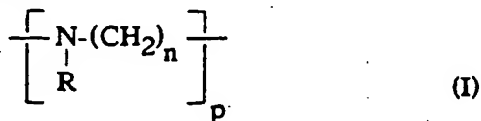
5 Avantageusement, le composé selon l'invention et plus particulièrement tout dérivé d'histone, de protamine ou de nucléoline peut être en outre polyglycosylé, sulfoné et/ou phosphorylé et/ou greffé à des sucres complexes ou à un composé lipophile comme par exemple une chaîne polycarbonée ou un dérivé du cholestérol.

10 La composition selon l'invention peut bien entendu comprendre plusieurs composés compactant l'acide nucléique, de nature différente. On peut ainsi associer un composé de type histone à un composé de type nucléoline.

15 Le composé selon l'invention est présent en quantité suffisante pour compacter l'acide nucléique selon l'invention. C'est ainsi que le rapport composé/acide nucléique (exprimé en poids) peut être compris entre 0,1 et 10 et plus préférentiellement entre 0,3 et 3.

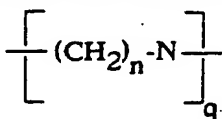
En ce qui concerne l'agent de transfection présent dans la composition selon l'invention, il est préférentiellement choisi parmi les polymères cationiques et les lipofectants.

20 Selon la présente invention, le polymère cationique est de préférence un composé de formule générale I,



dans laquelle

- R peut être un atome d'hydrogène ou un groupe de formule



25 - n est un nombre entier compris entre 2 et 10;
- p et q sont des nombres entiers,

étant entendu que la somme $p+q$ est telle que le poids moléculaire moyen du polymère soit compris entre 100 et 10^7 Da.

Il est entendu que, dans la formule (I) la valeur de n peut varier entre les différents motifs p . Ainsi, la formule (I) regroupe à la fois les homopolymères et les
5 hétéropolymères.

Plus préférentiellement, dans la formule (I), n est compris entre 2 et 5. En particulier, les polymères de polyéthylène imine (PEI) et polypropylène imine (PPI) présentent des propriétés tout à fait avantageuses. Les polymères préférés pour la mise en oeuvre de la présente invention sont ceux dont le poids moléculaire est compris
10 entre 10^3 et $5 \cdot 10^6$. A titre d'exemple, on peut citer le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI50K) ou le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 800 000 Da (PEI800K).

Le PEI50K ou Le PEI800K sont accessibles commercialement. Quant aux autres polymères représentés par la formule générale I, ils peuvent être préparés selon
15 le procédé décrit dans la demande de brevet FR 94 08735.

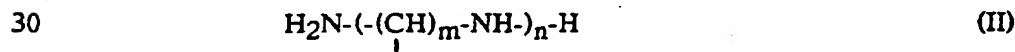
Pour obtenir un effet optimum des compositions de l'invention, les proportions respectives du polymère et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de sorte que le rapport molaire $R = \text{amines du polymère} / \text{phosphates de l'acide nucléique}$ soit compris entre 0,5 et 50, plus préférentiellement entre 5 et 30. Des résultats tout
20 particulièrement avantageux sont obtenus en utilisant de 5 à 25 équivalents d'amines de polymère par charge d'acide nucléique.

En ce qui concerne plus particulièrement les lipofectants, on entend couvrir au sens de l'invention, sous cette dénomination, tout composé à caractère lipidique et déjà proposé à titre d'agent actif à l'égard de la transfection cellulaire d'acides nucléiques.
25 De manière générale, il s'agit de molécules amphiphiles comprenant au moins une région lipophile associée ou non à une région hydrophile. A titre représentatif de la première famille de composés, on peut notamment proposer les lipides susceptibles de former des liposomes comme les POPC, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, cholestérol, maléimidophénylbutyrylphosphatidyléthanolamine, lactosylcéramide en
30 présence ou non de polyéthylène glycol pour former des liposomes furtifs ou, avec ou sans anticorps ou ligands, pour former des immunoliposomes ou des liposomes ciblés.

Selon un mode particulier de l'invention, l'agent lipidique mis en oeuvre possède une région cationique. Cette région cationique, préférentiellement polyamine, chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique inaccessible au milieu aqueux externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique.

On sait ainsi qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interfère, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permet ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN. Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques sont proposés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire. Une autre catégorie de lipides cationiques, les lipopolyamines, a également été décrite. Dans ce type de composés, le groupement cationique est représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires.

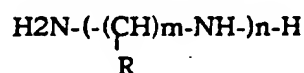
Avantageusement, les lipofectants convenant à l'invention peuvent également être choisis parmi des lipopolyamines dont la région polyamine répond à la formule générale (II)



dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 1 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre deux amines. Préférentiellement, m est compris entre 2 et 6

inclusivement et n est compris entre 1 et 5 inclusivement. Encore plus préférentiellement, la région polyamine est représentée par la spermine, la thermine ou un de leurs analogues ayant conservé des propriétés de liaison à l'ADN. Quant à la région lipophile, elle est représentée par au moins une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, un lipide naturel ou un lipide synthétique capable de former des phases lamellaires ou hexagonales, liée de manière covalente à la région hydrophile.

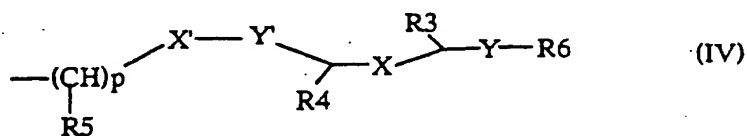
La demande de brevet EP 394 111 décrit d'autres lipopolyamines de formule générale III susceptibles d'être mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention.



dans laquelle R représente notamment un radical de formule générale $(\text{R}_1\text{R}_2)\text{N}-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-$.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement citer la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) et la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES).

Les lipopolyamines décrites dans la demande de brevet FR 94 14596 peuvent également être utilisées avantageusement à titre d'agent de transfection selon l'invention. Elles sont représentées par la formule générale IV ci-dessus dans laquelle R représente



avec

- X et X' représentant, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino

-NH- ou -NR'- avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄,

- Y et Y' représentant indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S,

- R₃, R₄ et R₅ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5,

5 - R₆ représentant un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino - NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut tout particulièrement citer le (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle et le (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2
10 propyle dit ci-après lipopolyamine A.

Les demandes de brevet EP 394 111 et FR 94 145 96 décrivent également un procédé utilisable pour la préparation des lipopolyamines correspondantes.

Enfin plus récemment, de nouvelles lipopolyamines, valorisables également dans le cadre de la présente invention, ont été décrites dans la demande de brevet FR
15 95/134 90. A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement mentionner celles qui suivent:

- lipopolyamine B:

{H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
(RP120525)

20 - lipopolyamine C:

H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₈]₂ (RP120535)

- lipopolyamine D:

H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈] (RP120531)

De manière particulièrement avantageuse, on peut utiliser dans le cadre de
25 l'invention la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), le (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle, le (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle, le {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂.

le $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{18}]_2$ ou le $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{18}]$.

Pour obtenir un effet optimum des compositions de l'invention, les proportions respectives de la polyamine et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de sorte que le rapport R charges positives de l'agent de transfection/ charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 0,1 et 10 et plus préférentiellement entre 0,5 et 6.

La présence d'un composé selon l'invention au sein d'une composition transfectante permet avantageusement de diminuer considérablement la quantité en agent de transfection. Il s'en suit une toxicité nettement amoindrie qui rend désormais possible par exemple la transfection de cellules sensibles à l'origine à l'agent de transfection comme par exemple les cellules hématopoïétiques avec les lipopolyamines. Enfin, comme le démontrent les exemples ci-après, le pouvoir transfectant des compositions selon l'invention est supérieur à celui obtenu avec les compositions transfectantes classiques.

Dans les compositions de la présente invention, l'acide nucléique peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent coder pour des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des séquences antisens, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique

ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression
5 insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par
10 exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de
15 croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, VEGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du
20 métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les
25 récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger, la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine GAX, la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation
30 de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et

bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou
5 plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements
immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des
microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides
10 antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences
permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide
15 antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de
séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes
20 eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de
25 régulation, etc.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en
amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique
synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut
être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir
30 de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Plus préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent en outre,
un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement
avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La demanderesse a en effet

montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

5 Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), le
10 di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

15 Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention, mettant en oeuvre à titre
20 d'agent de transfection un lipofectant, comprennent de 0,1 à 20 équivalents de lipide neutre pour 1 équivalent de lipopolyamine, et, plus préférentiellement, de 1 à 5. Dans le cas où l'agent de transfection est un polymère cationique, les compositions de l'invention comprennent, en plus du polymère cationique dans les rapports cités ci-avant, de 0,1 à 20 équivalents molaires de lipide neutre pour 1 équivalent molaire de
25 phosphate de l'acide nucléique, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc... De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un
30 véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions

stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents
5 paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée.

Elles peuvent être avantageusement utilisées pour transfecter une grande variété de type cellulaire comme par exemple les cellules hématopoïétiques, les
10 lymphocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules de mélanomes, de carcinomes et de sarcomes, les cellules musculaires lisses, les neurones et les astrocytes.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies utilisant la transfection in vitro, ex vivo ou in vivo d'un
15 acide nucléique apte à corriger ladite maladie en association avec un agent de transfection de type polymère cationique ou lipofectant, et un composé tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient la séquence correspondant audit produit
20 nucléique. Les compositions selon l'invention sont particulièrement intéressantes pour leur biodisponibilité et leur haut niveau de transfection.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un composé constitué en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou
(ATPAKKAA) avec le nombre de ces motifs pouvant varier entre 2 et 10, pour,
25 lorsqu'ils sont couplés à un ligand de récepteur cellulaire, un anticorps ou dérivé d'anticorps, cibler un acide nucléique vers des cellules exprimant les récepteurs ou anti-gènes correspondants. Dans cette perspective, un ligand, anticorps ou dérivé d'anticorps potentiel est couplé audit composé et l'on apprécie le pouvoir de transfection de cette molécule chimère comparativement au composé seul.

30 La présente invention couvre également toute utilisation d'un oligopeptide sélectionné parmi:

(ATPAKKAA)₂(COOH),

(KTPKKAKKP)₂(COOH),

ATPKKSAKKTPKKAKKP(COOH),
 KKA KSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA(COOH), SRSRYRQRQRSRRRRR
 (COOH) et RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR(COOH).

- 5 pour effectuer le transfert in vitro, ex vivo et/ou in vivo d'au moins un acide nucléique,
 ledit oligonucléotide étant associé ou non à un élément de ciblage.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Matériel et Méthodes :

1. Plasmides utilisés pour le transfert de gènes in vivo

- 10 Les constructions utilisées pour mettre en évidence l'activité des compositions de l'invention sont des plasmides comportant le gène codant pour la luciférase (Luc)

- Il s'agit notamment de plasmides pCMV luc, pXL 2621, pXL 2622, qui tous contiennent le gène codant pour la luciférase (tiré du vecteur pGL2, Promega) en aval du promoteur du cytomegalovirus (CMV) extrait de pCDNA3 (Invitrogen). pCMV
 15 luc et pXL2622 dérivent d'un vecteur pGL2, pXL 2621 d'un vecteur pGL2 contrôle, et dans tous ces vecteurs le promoteur SV40 a été remplacé par le promoteur CMV.

- De manière générale les plasmides sont obtenus par le technique de précipitation au PEG (Ausubel), et stockés dans du Tris 10mM EDTA 1mM pH 8 à 4
 20 °C à une concentration d'environ 10 µg d'ADN par µl.

2. Composés utilisés selon l'invention:

H: KTPKKAKKPKTPKKAKKP(COOH) 18 AA

N: ATPAKKAAATPAKKAA(COOH) 16 AA

nls-H: PKKKRKV-bAla-KTPKKAKKPKTKKAKKP(COOH) 26 AA

- 25 PR1: RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR 21 AA

PR2: SRSRYRQRQRSRRRRR

Ils ont été préparés comme suit:

2.1 N: ATPAKKAAATPAKKAA(COOH)

Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique au moyen d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A, sur une résine HMP (Applied Biosystem) et selon une stratégie FMOC. Après la synthèse, le peptide a été libéré de la résine par traitement 90 minutes en présence d'une solution eau/TFA 1/19. Après filtration, la solution est concentrée sur évaporateur rotatif, puis le peptide est précipité 2 fois par addition d'éther tertibutylméthylique à partir de solution dans le TFA. Le culot final est lavé par l'éther tertibutylméthylique puis séché. Le peptide est solubilisé dans 5 ml d'eau, filtré et purifié par HPLC phase inverse sur colonne C18 100 A (Biorad RSL). le peptide est purifié par à l'aide d'un gradient de 0 à 25% d'acétonitrile, 0,07% TFA dans l'eau 0,07% TFA. La pureté du peptide obtenu est supérieure à 95% et sa solubilité dans l'eau de 100 mg/ml.

2.2 nls: PKKKRKV

Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique selon le protocole décrit ci-dessus en utilisant pour le clivage une solution eau/TFA/phénol/éthanedithiol/thioanisole 2/ 40/3/1/2 (v/v). La pureté du peptide obtenu est supérieure à 95% et sa solubilité dans l'eau de 100 mg/ml à pH 2,1.

2.3 H: KTPKKAKKPKTKKAKKP(COOH) et nls-H: PKKKRKV-bAla-KTPKKAKKPKTKKAKKP(COOH)

Ces oligopeptides sont synthétisés sous forme de sel d'acide trifluoroacétique selon le protocole décrit ci-dessus. Pour ce faire, on divise la résine en deux lots. Un premier lot destiné à la synthèse de H est traité pour le clivage avec une solution TFA/phénol/éthanedithiol/thioanisole/eau 40/3/1/2/2 (v/v). La pureté du peptide obtenu est supérieure à 90% et sa solubilité dans l'eau de 10 mg/ml à pH 2,1. Sur le second lot de résine la synthèse est poursuivie de manière à obtenir nls-bAla-H. La solution de clivage mise en oeuvre est identique à la précédente. La pureté du peptide obtenu est supérieure à 95 % et sa solubilité dans l'eau de 10 mg/ml à pH 2,1.

2.4 PR1 SRSRYRORORSRRRRRR et PR2: RRRLHRIHRROHRSCRRRKRR

Ces oligopeptides sont assemblés en plusieurs étapes, en synthèse phase solide selon la technique BocBenzyle. La résine de départ est une résine Boc-L-

Arg(Tos)Pam (0,48meq/g).. Le procédé de déprotection et couplage mis en oeuvre est le suivant:

- | | | |
|----|---|-----------|
| | 1- 55 % TFA dans du dichlorométhane (DCM) | 1 x 2 mn |
| | 2- 55 % TFA dans du dichlorométhane | 1 x 30 mn |
| 5 | 3- DCM | 2 x 1mn |
| | 4- DMF | 3 x 1 mn |
| | 5- Couplage | |
| | 6- DMF | 2 x 1mn |
| | 7- DCM | 2 x 1 mn |
| 10 | Pour chaque étape, on utilise 10ml de solvant par gramme de résine peptide mis en oeuvre. Le couplage de tous les acides aminés (en triple excès) est effectué dans le DMF en présence de BOP, Hobt et DIEA. Chaque étape de couplage est contrôlée par le test ninhydrine | |

- 15 Le peptide final est récupéré de la résine et entièrement déprotégé avec de l'acide fluorhydrique liquide. On utilise 10 ml de HF par gramme de peptide résine à 0°C pendant 45 minutes en présence de para-crésol et d'éthanedithiol. Après évaporation de l'acide fluorhydrique le mélange réactionnel brut est lavé avec de l'éther, dissous dans de l'acide trifluoroacétique, précipité à l'éther et séché.

3. Agents lipofectants mis en oeuvre

- 20 Lipopolyamine A:
(Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate d1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle (RP115335)
- Lipopolyamine B:
25 $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$
(RP120525)
- Lipopolyamine C:
 $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{18}]_2$ (RP120535)
- Lipopolyamine D:
 $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]_2$ (RP120531)

30 EXEMPLE 1:

Transfert d'acide nucléique in vitro dans des cellules NIH 3T3

Cet exemple décrit le transfert d'acides nucléiques in vitro (sur cultures cellulaires) au moyen d'une composition selon l'invention comprenant l'acide nucléique, un composé selon l'invention, et une lipopolyamine dans différentes conditions de pH et de tampon.

5 1. On prépare un mélange de 10µl composé comme suit:

- 0,5µg d'ADN plasmidique pCMV-luc, 0,25µg d'un composé selon l'invention, dans une solution tampon telle qu'identifiée,

- du dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) 40mM dans des rapports de charges X tels qu'indiqués dans chacun des essais.

10 2- $5 \cdot 10^4$ cellules des lignées NIH3T3 sont incubées avec le mélange précédent à 37°C, sous une atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture pendant 48 heures dans un milieu contenant 10 % de sérum (DMEM 10 %SVF).

15 Le tapis cellulaire est ensuite lysé dans 50µl de tampon lyse (Promega), récupéré puis centrifugé à 20 000g pendant 5 minutes.

L'activité luciférase est mesurée sur 4µl du surnageant en ajoutant 20µl de substrat (Promega). La lecture se fait sur luminomètre LKB en cumulant les RLU (relative lights units) sur 20 secondes.

Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2 ci-après.

20 3. Compaction dans NaCl 150mM. HEPES* (* N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(acide2-éthyl-sulfonique) 10mM à pH 7.1

Rapport de charge DOGS/ADN	sans composé (R.L.U)	avec H (R.L.U)
0,8 X	32	850
1,8 X	220	23700
3 X	5400	21750

TABLEAU 1

4. Compaction dans D-glucose 5 %, NaCl 150mM, avec HEPES 10mM (pH de la solution de compaction: 7,2)

Rapport de charge DOGS/ADN	sans composé (R.L.U)	avec H (R.L.U)	avec N (R.L.U)
0,8 X	880	44000	1450
1,8 X	6600	156500	-
3 X	22000	297500	90300

TABLEAU 2

5 Dans l'ensemble des essais, on note des résultats supérieurs lorsque la composition compactante associée à DOGS un composé selon l'invention. Il s'avère possible de diminuer de manière importante la quantité en DOGS sans porter préjudice à la capacité de transfection de la composition correspondante.

EXEMPLE 2 :

Essais de transfection en présence d'un lipide neutre

10 On prépare un mélange de 10 μ l composé comme suit:

- 0,5 μ g d'ADN plasmidique pCMV-luc, 0,25 μ g d'un composé selon l'invention, dans une solution tampon NaCl 150mM, tampon phosphate 10mM pH 7,4,

15 - 40mM de dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) dans des rapports de charges X tels qu'indiqués dans chacun des essais en présence de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) avec DOGS/DOPE égal à 1/2.

Dans ce cas particulier, une solution éthanolique de DOGS à 40 mM est mélangée avec un volume égal d'une solution de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) à 80 mM, préparée dans un mélange chloroforme/éthanol (1/5). Ainsi pour un équivalent de DOGS la composition contient deux équivalents de DOPE.

20 10⁵ cellules des lignées NIH3T3 sont incubées avec ce mélange dans les conditions décrites dans l'exemple précédent. A l'issue de l'incubation, ces cellules sont traitées selon le protocole de ce même exemple. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

Rapport de charge DOGS/ADN	sans composé (R.L.U)	avec H (R.L.U)	avec chimère nls-H (R.L.U)
0,8 X D/D	24	3175	760
1 X D/D	19	7410	2380
1,8 X D/D	1800	39500	52800

TABLEAU 3

Ces résultats confirment ceux observés en exemple 1. En présence d'un composé basique selon l'invention et plus particulièrement de H, il est possible de réduire de moitié la quantité en lipofectant.

5 EXEMPLE 3 :

Variation du rapport composé selon l'invention/ADN au sein d'une composition transfectante selon l'invention.

3.1: En présence d'une composition DOGS

1. On prépare un mélange de 10µl composé de:

- 10 - 0,75µg d'ADN plasmidique pCMV-luc, et d'un composé selon l'invention dans le rapport indiqué, dans une solution tampon D-glucose 5 %, NaCl 150mM, avec HEPES 10mM (pH de la solution de compaction : 7,2),
- du dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) 40mM dans un rapport de charge 1,8X.

- 15 2.- 4.10⁵ cellules des lignées NIH3T3 sont incubées avec le mélange précédent à 37°C, sous une atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture pendant 48 heures dans un milieu contenant 10 % de sérum (DMEM 10 %SVF). Le tapis cellulaire est ensuite lysé, 45 heures après la transfection, dans 100 µl de tampon lyse (Promega), récupéré puis centrifugé à
- 20 20000g pendant 5 minutes. L'activité luciférase est mesurée sur 5 µl du surnageant en ajoutant 25 µl de substrat (Promega). La lecture se fait sur luminomètre LKB en cumulant les RLU (relative lights units) sur 20 secondes.

Les résultats figurent dans le tableau 4 ci-après.

PEP/ADN w/v	avec H (R.L.U)	avec H-nls (R.L.U)	avec N (R.L.U)
0	2 150	2 150	2 150
0,25	3 300	38 000	35 000
0,5	45 000	100 000	35 000
1	84 000	105 000	13 000
2	105 000	200 000	20 000

TABLEAU 4

3.2: En présence de DOGS/DOPE 1,8X

- On procède selon le protocole décrit précédemment en 3.1 mais en utilisant à titre d'agent de transfection une solution de 40mM de dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) 1,8X en présence de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) avec DOGS/DOPE égal à 1/2, préparée selon le mode opératoire présenté en exemple 2.

Le tableau 5 rend compte des résultats observés.

COMPOSE /ADN w/v	H (R.L.U)	H-nls (R.L.U)	N (R.L.U)
0	580	580	580
0,25	13 000	5 600	7 600
0,5	11 000	18 500	1 800
1	14 100	36 000	13 600
2	16 500	58 000	14 100

TABLEAU 5

10 EXEMPLE 4 :

Variation du rapport composé selon l'invention/ADN au sein d'une composition transfectante selon l'invention en utilisant un agent de transfection autre que le DOGS.

3.1: En présence du (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle (lipopolyamine A)

- 15 1. On prépare un mélange de 10µl composé de:
- 0,55µg d'ADN plasmidique pCMV-luc, et d'un composé selon l'invention dans le rapport indiqué, dans une solution tampon NaCl 150mM,

- du (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propyl-amino)-2 propyle dans dans les rapport de charge indiqués.

- 2.- 5.10^4 cellules des lignées NIH3T3 sont incubées avec le mélange précédent à 37°C, sous une atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture pendant 48 heures dans un milieu contenant 10 % de sérum (DMEM 10 %SVF). Le tapis cellulaire est ensuite lysé, 45 heures après la transfection, dans 100 µl de tampon lyse (Promega), récupéré puis centrifugé à 20000 g pendant 5 minutes. L'activité luciférase est mesurée sur 10 µl du surnageant en ajoutant 50 µl de substrat (Promega). La lecture se fait sur luminomètre Berthold lumat 9501® en cumulant les RLU (relative lights units) sur 10 secondes. Les résultats figurent dans le tableau 6 ci-après.

LIPOFECTANT	sans composé .10 ⁶ .R.L.U	avec H .10 ⁶ .R.L.U			avec nls-H .10 ⁶ .R.L.U		
Rapport NH ₂ du lipofectant / phosphates de l'ADN	Rapport composé/ADN						
	0	0,5	1	2	0,5	1	2
1,8X	3,9	30,4	32,7	4,1	52,4	58,5	39,3
3X	8,9	41,5	61,3	16,6	64,1	60,4	49,2
6X	6,2	23,6	22,3	15,6			

TABLEAU 6

4.2: En présence du PEI 800K

1. On procède selon le protocole décrit en 4.1 et dans un même milieu, en utilisant à titre de lipofectant le PEI 800K. Les résultats figurent dans le tableau 7 ci-après.

PEI 800K	Sans composé .10 ⁶ .R.L.U	H .10 ⁶ .R.L.U				nls-H .10 ⁶ .R.L.U	
Equivalent d'amines de polymère par phosphate de l'ADN	Rapport composé/ADN						
	0	0,5	1	2	0,5	1	2
6	7,7	4,9	7	12,3	4	7,3	8,8
9	5	8	11,6	4	16,3	11	12,1
12	7,5	11,3	17,1	1,2			

TABLEAU 7

EXEMPLE 5**Transfert in vivo dans des cellules de muscles.**

- 5 Les essais correspondants sont réalisés en mettant en oeuvre les matériels et protocoles suivants:

Modèle: L'injection se pratique dans le muscle tibial cranial de souris C57 bl6 ou OF1 adultes (âgées de plus de 8 semaines)

- 10 **Protocole:** L'ADN est dilué à 0,5 mg/ml dans une solution qui contiendra en final NaCl 150mM, D-Glucose 5 %. Dans certains groupes, avant injection, du peptide en solution à 1 mg/ml dans l'eau est ajouté à l'ADN en quantité suffisante pour atteindre les rapports poids/poids indiqués. Une incubation d'au moins 20 minutes à température ambiante est réalisée avant de procéder à l'injection.

- 15 **Détermination des résultats:** Deux jours après l'injection, le muscle est prélevé, haché dans 750 µl de tampon de lyse (Promega E153A) additionné d'aprotinine (Sigma). Le prélèvement est homogénéisé dans un broyeur (Heidolf), et 10 µl servent à la mesure de l'activité luciférase. Cette mesure est effectuée avec un luminomètre Lumat 9501 (Berthold), en totalisant l'émission émise pendant 10 secondes après addition de 50 µl de substrat luciférase (Promega) aux 10 µl de l'échantillon. Le bruit de fond mesuré avant addition de substrat est soustrait à ce total, et l'activité est exprimé en RLU
- 20 (relative light units) totaux (rapportés aux 750 ml de tampon de lyse).

Pour ce faire, 40 μ l (20 μ g d'ADN) sont injectés, en présence d'HEPES à pH 7,4 5 mM final dans la solution, puis ajout de la lipopolyamine C(RPR 120 535) dans un rapport 0,01 nmol/ μ l d'ADN 20 minutes avant injection:

Peptide, Rapport peptide / ADN poids/poids	Moyenne RLU	écart type RLU	nombre d'animaux
sans peptide	15 228 125	14 618 681	6
nls-H, 0,025 poids/poids +lipopolyamine C	42 722 500	66 485 348	6

5

TABLEAU 8

Ces résultats confirment l'effet bénéfique de l'association d'une lipopolyamine à un agent compactant selon l'invention sur la transfection in vivo dans le muscle d'un acide nucléique.

EXEMPLE 6

10 Transfert in vivo de compositions revendiquées dans des cellules tumorales

Les essais correspondants sont effectuées sur des souris C57/BL 6 adultes (>8 semaines) femelles portant des tumeurs de type 3LL (Lewis Lung carcinoma) obtenues par passage de fragments de tumeur d'animal à animal, implantés sous la peau au niveau du flanc.

- 15 En ce qui concerne les solutions injectées elles sont préparées comme suit: L'ADN est d'abord solubilisé dans le tampon, le peptide est alors éventuellement ajouté, et après 20 minutes une solution de lipides cationiques à forte concentration (20 ou 40 mM) est ajoutée au mélange. Après addition de tous les produits, le mélange contient, outre l'ADN, le peptide et le lipide cationique, NaCl 150mM, D-Glucose 5 % et MES 5mM
- 20 pH 6,2. Dans le cas des deux dernières séries avec la lipopolyamine C (RPR 120 535), le véhicule d'injection est NaCl 75 mM et NaCl 150mM, D-glucose 5 %, respectivement.

L'injection est réalisée 20 à 30 minutes après la préparation de la solution.

- 25 On réalise l'injection de chaque composition transfectante (voir tableaux 9 et 10 pour leurs spécificités respectives) dans la tumeur 7 jours après implantation, la souris étant anesthésiée avec un mélange Kétamine 130 mg/kg+ Xylazine (4 mg/mg).

Deux jours après l'injection, on prélève le tissu tumoral qui est pesé puis haché et broyé dans 500 μ l tampon de lyse (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Après centrifugation (20000 g pendant 10 minutes), on prélève 10 μ l qui servent à l'évaluation de l'activité luciférase par mesure de l'émission lumineuse totale obtenue
5 après mélange avec 50 μ l de réactif (Promega Luciferase Assay Substrate) dans un luminomètre Lumat LB 9501 (Berthold), intégration sur 10 secondes.

L'activité résultante est exprimée en RLU (Relative Lights Units) estimés dans la totalité du surnageant de lyse tumorale, ou en RLU par μ g d'ADN injecté.

Le tableau 9 rend compte de résultats obtenus en présence de diverses lipopolyamines
10 A, B, C ou D et le tableau 10 en présence de PEI.

Plasmide		Peptide		Lipide Cationique		Résultat, RLU/tumeur		Nbre d'animaux traités
µg/tumeur	[ADN] µg/µl	référence	pept/AD N w/w	référence	nmol/ µg ADN	moyenne	écart-type	
20	2					0	0	5
20	2			A	1,8	142 300	121 418	5
20	2	H	1	"	1,8	301 730	243 166	5
30	2			"	3	99 775	128 726	6
30	2	H	1	"	3	1 340 460	1 771 624	5
7,5	0,5			A	3	88 712	49 314	5
7,5	0,5	H	1	"	3	383 313	234 713	6
7,5	0,5	H	1,5	"	3	618 025	530 774	6
15	1	H	1	"	3	1 017 372	966 141	5
10	0,5				3	679 258	414 286	9
10	0,5	H	1,5	C	3	395 433	219 333	10
				D	3			
18,75	0,25			C	2	222 700	126 036	6
18,75	0,25	Pr 2	0,5	"	2	1 046 050	612 401	6
20	0,5			C	4	806 467	887 206	6
20	0,5	H	1	C	4	1 348 233	1 674 106	6

TABLEAU 9

Plasmide		Peptide		Polyethylene imine		Résultat, RLU /tumeur		Nbre d'animaux traités
quantité injectée	[ADN] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	référence	pept/ADN w/w	taille	Eq	moyenne	écart-type	
20	2			800 K	9	0	0	5
20	2					54 350	52 989	5
50	2			800 K	9	7 783	16 803	6
50	2	H 1	1	800 K	9	62 230	71 462	5
50	2			800 K	12	6 733	16 493	6
50	2	H 1	1	800 K	12	72 700	150 300	5
40	2			800 K	18	470	1 051	5
40	2	H 1	1	800 K	18	82 608	104 443	6
40	2			800 K	24	1 630	3 645	5
40	2	H 1	1	800 K	24	45 750	63 942	5
10	0,5	H 1	1,5	50 K lactose	12	14 152	16 946	11
10	0,5	H 1	1,5	50 K maltose	12	12 942	22 853	11

TABLEAU 10

EXEMPLE 7**Transfert d'acide nucléique in vitro dans des cellules 3LL**

- Cet exemple décrit le transfert d'acides nucléiques in vitro (sur cultures cellulaires) au moyen d'une composition selon l'invention comprenant l'acide nucléique, un composé selon l'invention choisi parmi les dérivés de protamines et une lipopolyamine dans une solution de NaCl 75 mM final.

On prépare un mélange de 10 µl composé comme suit:

- 0.5 µg d'ADN plasmidique pCMV-luc, 0,5 µg de PR1 ou PR2 un composé selon l'invention, dans une solution de NaCl 75 mM final
- Lipopolyamine C (RPR 120535) dans des rapport de charges tels qu'indiqués dans chacun des essais répertoriés dans le tableau 11 ci-après.

- 1.10⁵ cellules 3LL (dans 250 µl de milieu de culture DMEM avec 10 % de sérum de veau foetal) sont incubées avec le mélange précédent à 37°C sous une atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 4 heures. 500 µl de milieu de culture sont ajoutés et les cellules sont remises en culture. Le lendemain, les cellules sont lavées et remises en culture pendant 24 heures dans le même milieu contenant 10 % de sérum de veau foetal.

Le tapis cellulaire est ensuite lysé dans 100 µl de tampon de lyse (Promega). L'activité luciférase est mesurée en ajoutant 50 µl de substrat (Promega). La lecture se fait sur le luminomètre LB en cumulant les RLU (relative Light Unit) sur 10 secondes.

- Les tableaux 11 et 12 rendent compte respectivement des essais avec PR1 et PR2.

RAPPORT DE CHARGE Lipopolyamine C/ADN	SANS COMPOSE (RLU)	AVEC PR2 (RLU)
4X	107 289	447 214
6X	77 396	1 182 641
8X	14 512	729 285

TABLEAU 11

RAPPORT DE CHARGE Lipopolyamine C/ADN	SANS COMPOSE (RLU)	AVEC PR2 (RLU)
4X	12 037	6 304
6X	901	113 113
8X	328	294 743

TABLEAU 12

EXEMPLE 8:**Injections in vivo de peptides compactants selon l'invention sans lipofectant dans des tumeurs****Modèle:**

- 5 - souris de type Swiss/nude femelles adulte
- tumeurs expérimentales induites après injection de 10^7 cellules 3T3 HER2 par voie sous-cutanée au niveau du flanc.
- injection du mélange de transfection 7 à 12 jours après l'injection des cellules. La solution d'ADN compacté ou non à du peptide est injectée directement dans la tumeur
- 10 avec une seringue de type Hamilton.
- deux jours après l'injection, prélèvement du tissu tumoral, qui est pesé puis haché et homogénéisé dans 750 μ l tampon de lyse (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Après centrifugation (20 000 g pendant 10 minutes), on prélève 10 μ l qui servent à l'évaluation de l'activité luciférase par mesure de l'émission lumineuse totale obtenue
- 15 après mélange avec 50 μ l de réactif (Promega Luciferase Assay Substrate) dans un luminomètre Lumat LB 9501 (Berthold), intégration sur 10 secondes.

L'activité résultante est exprimée en RLU (Relative Lights Units) estimés dans la totalité du surnageant de lyse tumorale.

- Protocole: L'ADN est dilué à 0,5 mg/ml dans une solution qui contiendra en final les
- 20 sels, le tampon et le glucose en quantité finale telle que mentionnée dans le tableau de résultats. Dans certains groupes, avant injection, du peptide en solution à 1 mg/ml dans l'eau est ajouté à l'ADN en quantité suffisante pour atteindre les rapports poids/poids indiqués. Une incubation d'au moins 20 minutes à température ambiante est réalisée. Les souris reçoivent une injection de 20 μ l, soit 10 μ g d'ADN au total par
- 25 tumeur.

Tampon	Peptide		Résultat, RLU /tumeur		Nbre d'animaux traités
	NaCl/gluc/ MES ou HEPES 5mM	référence pept/ ADN w/w	moyenne	écart-type	
150/HEPES	nls-H	0,02	1 689 938	1 388 072	6
			6 819 100	5 860 709	6
150/5/HEPES	nls-H1	0,1	369 563	577 901	6*
			1 654 313	2 145 147	6*
			4 031 000	1 007 896	6*
	H	0,1	931 275	214 229	4
			3 420 432	1 285 704	6

TABLEAU 13

*: souris endormies pendant l'injection, par narco-neuroleptanalgie avec un mélange Imalgène+ Rompun (Ketamine 130 mg/kg, Xylazine 4 mg/kg, voie intra-péritonéale).

- 5 Ces résultats montrent que, dans des tumeurs susceptibles de pouvoir être transfectées par de l'ADN nu, l'addition de peptide avec des faibles rapport peptide/ADN, sans association de lipides cationiques, permet d'augmenter l'expression du gène exogène par rapport à l'ADN nu seul.

LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(1) DEPOSANT:

- 10 (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
(G) TELEPHONE: 40.91.69.22
15 (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96

(11) TITRE DE L' INVENTION: COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES
NUCLEIQUES, PREPARATION ET UTILISATION

(111) NOMBRE DE SEQUENCES: 9

20 (1v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30 (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (11) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro

5

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

45 (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 8 acides aminés.
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (11) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala

55

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala

5

10

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys

5

10

15

Lys Pro

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ala Lys Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro

5

10

15

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 26 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Lys Lys Ala Lys Ser Pro Lys Lys Ala Lys Ala Ala Lys Pro Lys Lys Ala
5 10 15

Pro Lys Ser Pro Ala Lys Ala Lys Ala

20 25

20

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 30 (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Ser Arg Ser Arg Tyr Tyr Arg Gln Arg Gln Arg Ser Arg Arg Arg Arg

5 10 15

Arg

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Arg Arg Arg Leu His Arg Ile His Arg Arg Gln His Arg Ser Cys Arg Arg

5

10

15

Arg Lys Arg Arg

5

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

10

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

20

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro

5

10

15

Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro

20

25

25

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique utile pour la transfection d'un acide nucléique caractérisée en ce qu'elle contient outre ledit acide nucléique, au moins un agent de transfection et un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique, ledit composé dérivant en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés.
2. Composition pharmaceutique utile pour la transfection d'un acide nucléique contenant outre ledit acide nucléique, un agent de transfection et au moins un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique caractérisée en ce que ledit composé est constitué en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA) répétés de manière continue ou non, le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2 caractérisée en ce que les motifs peptidiques peuvent être séparés entre eux par des liens de nature biochimique de type acides aminés et/ou de nature chimique.
4. Composition pharmaceutique selon la revendication 3 caractérisée en ce qu'il s'agit de liens constitués d'un ou plusieurs acides aminés.
5. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 à 4 caractérisée en ce que le composé dérive de l'histone H1.
6. Composition pharmaceutique selon la revendication 5 caractérisée en ce que le composé dérive du domaine C- terminal de l'histone H1.
7. Composition pharmaceutique selon la revendication 5 ou 6 caractérisée en ce qu'il s'agit de préférence d'un oligopeptide choisi parmi (KTPKKAKKP)₂(COOH), ATPKSAKKTPKKAKKP(COOH), et KKAKSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA(COOH).
8. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le composé dérive du domaine N- terminal de la nucléoline.

9. Composition pharmaceutique selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit du peptide (ATPAKKAA)₂(COOH).

10. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 caractérisé en ce que le composé dérive de la protamine.

5 11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un oligopeptide choisi parmi SRSRYRQRQSRRRRRR(COOH) et RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR(COOH).

12. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que ledit composé possède une structure en feuillet β .

10 13. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisée en ce que ledit composé est en outre associé à un ligand de récepteur cellulaire.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'il s'agit de tout ou partie de l'histone H1 associé à une séquence signal de
15 localisation nucléaire.

15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit du peptide PKKKRKV-bAla-(KTPKKAKKP)₂(COOH).

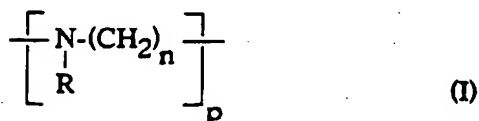
16. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisée en ce que ledit composé est en outre associé à un peptide de type
20 fusogène favorisant la transfection cellulaire de ladite composition.

17. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 16 caractérisée en ce que ledit composé est en outre polyglycosylé, sulfoné, phosphorylé et/ou greffé à des sucres complexes ou à un agent lipophile.

18. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de transfection est un polymère cationique ou un
25 lipofectant.

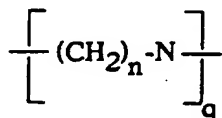
19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce que le lipofectant est un lipide susceptible de former des lipisomes, des liposomes furtifs, des immunoliposomes ou des liposomes ciblés.

20. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce que le polymère cationique est de préférence un composé de formule générale (I) :



dans laquelle

- 5 - R peut être un atome d'hydrogène ou un groupe de formule



- n est un nombre entier compris entre 2 et 10;

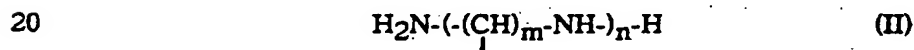
- p et q sont des nombres entiers,

- 10 avec la somme p+q étant telle que le poids moléculaire moyen du polymère soit compris entre 100 et 10^7 .

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce que le polymère cationique est choisi parmi le polyéthylène imine (PEI) et le polypropylène imine (PPI).

- 15 22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce que le polymère est choisi parmi le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 (PEI50K) et le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 800 000 (PEI800K).

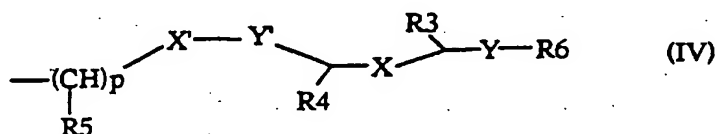
23. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce que le lipofectant comprend au moins une région polyamine de formule générale (II)



- 25 dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre 2 amines associée de manière covalente à une région lipophile de type chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, ou un lipide naturel ou synthétique capable de former des phases lamellaires ou hexagonales.

24. Composition pharmaceutique selon la revendication 23 ou 24 caractérisée en ce que la région polyamine est représentée par la spermine, la thermine ou un de leurs analogues ayant conservé ses propriétés de liaison à l'acide nucléique.

25. Composition pharmaceutique selon la revendication 23 caractérisée en ce que le lipofectant comprend au moins une région lipophile représentée par la formule générale (IV)



dans laquelle

- X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino

-NH- ou -NR'- avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄,

- Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S,

- R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5,

- R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

26. Composition pharmaceutique selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il s'agit de préférence d'une lipopolyamine choisie parmi la dioctadécyamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), le (Dioctadécy-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle ou le (Dioctadécy-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2-propyle, le $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N}\{(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$, le $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{18}]_2$ ou le $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{18}]$.

27. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 et 23 à 26 caractérisée en ce que l'agent de transfection est la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS).

28. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes
5 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.

29. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 27 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.

30. Composition pharmaceutique selon la revendication 28 ou 29 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.

10 31. Composition pharmaceutique selon la revendication 28, 29 ou 30 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.

32. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 28 à 30 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

15 33. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes comprenant en outre un ou plusieurs lipides neutres.

34. Composition pharmaceutique selon la revendication 33 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

20 35. Composition pharmaceutique selon la revendication 33 ou 34 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le distéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides),
25 les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

36. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 35 pour le transfert in vitro, ex vivo et/ou in vivo d'acides nucléiques.

37. Utilisation d'un composé constitué en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA) avec le nombre de ces motifs pouvant varier entre 2 et 10, pour, lorsqu'il est couplé à un ligand de récepteur cellulaire, un anticorps ou dérivé d'anticorps, cibler, in vitro, ex vivo et/ou in vivo, un acide nucléique vers des
- 5 cellules exprimant les récepteurs ou anti-gènes correspondants.

38. Utilisation d'un oligopeptide sélectionné parmi :
- (ATPAKKAA)₂(COOH),
(KTPKKAKKP)₂(COOH),
ATPKSAKKTPKKAKKP(COOH),
10 KKA KSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA(COOH),
SRSRYRQRQSRRRRRR(COOH). et
RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR(COOH).
pour effectuer le transfert in vitro, ex vivo et/ou in vivo d'au moins un acide nucléique, ledit oligonucléotide étant associé ou non à un élément de ciblage.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/87 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA, vol. 950, no. 2, 13 July 1988, pages 221-228, XP002008071 BOETTGER, M. ET AL.: "Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMGI results in efficient transfection" see the whole document ---	1
X	DNA, vol. 6, no. 1, February 1987, pages 81-89, XP002008072 WIERNHUES, U. ET AL.: "A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells" see the whole document ---	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 1996

Date of mailing of the international search report

23.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GNBH & GENENTECH INC.) 28 November 1991 see claims 11-13 ---	1
X	EP,A,0 388 758 (THE BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 26 September 1990 see claims ---	1,13
A	JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 23, no. 2, February 1989, pages 187-194, XP002008073 CORNETTA, K. & ANDERSON, W.F.: "Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene transfer: implications for human gene therapy" see the whole document ---	1
X	PROTOPLASMA, vol. 96, 1978, pages 209-223, XP002008074 DUBES, G.R. & WEGRZYN, R.J.: "Rapid ephemeral cell sensitization as the mechanism of histone-induced and protamine-induced enhancement of transfection by poliovirus RNA" see the whole document ---	1
A	WO,A,93 19768 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 14 October 1993 see claims -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR96/00248

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See annex.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR96/00248

Comment: although claims 36-38 concern an (in vivo) method for treatment of the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)), the search has been based on the effects attributed to the products (composition).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9117773	28-11-91	DE-A- 4110410	01-10-92
		AT-T- 126442	15-09-95
		DE-D- 59106279	21-09-95
		EP-A- 0532525	24-03-93
		ES-T- 2078521	16-12-95

EP-A-388758	26-09-90	AU-B- 637085	20-05-93
		AU-B- 5137290	20-09-90
		CA-A- 2012311	16-09-90
		IL-A- 93755	31-12-95
		JP-A- 3200800	02-09-91
		US-A- 5354844	11-10-94

WO-A-9319768	14-10-93	AU-B- 4027893	08-11-93
		CA-A- 2133323	14-10-93
		EP-A- 0636028	01-02-95
		JP-T- 7505639	22-06-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: de Internationale No
PCT/FR 96/00248

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/87 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA, vol. 950, no. 2, 13 Juillet 1988, pages 221-228, XP002008071 BOETTGER, M. ET AL.: "Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMGI results in efficient transfection" voir le document en entier ---	1
X	DNA, vol. 6, no. 1, Février 1987, pages 81-89, XP002008072 WIERNHUES, U. ET AL.: "A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells" voir le document en entier --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Juillet 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00248

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GNBH & GENENTECH INC.) 28 Novembre 1991 voir revendications 11-13 ---	1
X	EP,A,0 388 758 (THE BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 26 Septembre 1990 voir revendications ---	1,13
A	JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 23, no. 2, Février 1989, pages 187-194, XP002008073 CORNETTA, K. & ANDERSON, W.F.: "Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene transfer: implications for human gene therapy" voir le document en entier ---	1
X	PROTOPLASMA, vol. 96, 1978, pages 209-223, XP002008074 DUBES, G.R. & WEGRZYN, R.J.: "Rapid ephemeral cell sensitization as the mechanism of histone-induced and protamine-induced enhancement of transfection by poliovirus RNA" voir le document en entier ---	1
A	WO,A,93 19768 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 14 Octobre 1993 voir revendications -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR96/00248

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n° se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Voir annexe.

2. ☐ Les revendications n° se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. ☐ Les revendications n° sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.